Journal of Education and Science
Vol. 28, No.3, 2019, pp.52-72
ISSN 1812-125X
http://edusj.mosuljournals.com

Isolation of Prolidase from Amniotic Fluid and Study of its Kinetic and Affinity Properties Towards Pharmacological Compounds

Luay Abed Al-Helaly

Department of Chemistry / College of Science
Mosul University
Mosul- Iraq

Luayhelaly@uomosul.edu.iq

DOI: 10.33899/edusj.2019.162958

Received	Accepted
07 / 01 / 2019	27 / 02 / 2019

ABSTRACT

The research included the isolation of prolidase from human amniotic fluid using different biochemical techniques, One proteinous peak had been isolated by gel filtration using sephadex (G-50) and from sephadex (G-100) that produced by ammonium sulphate precipitation (60%) after dialysis. The approximately molecular weight of the enzyme using gel filtration chromatography (G-100) was (52269.7) Dalton and specific activity of 13516.6 unit/mg protein with 75 fold of purification. The results showed that the optimum conditions of purified enzyme from amniotic fluid were at (50 µg/ml) of protein as a source of the enzyme using (60 mM/L) Tris-HCl buffer solution at pH (8.0) act for (32) minutes at (39°C). Using Line Weaver-Burk plot, the values of maximum velocity (V_{max}) and Michaelis constant (K_m) were found to be (3448.2 U/L) and (10 mM/L) respectively using Gly-Pro as a substrate.

Finally, also, involved the study of the effect pharmacological chemicals compounds on the enzyme activity, the results showed that the drug chemical compounds for type ceramide, metoclopramide, pseudoephedrine, diphenhydramine-HCl, chloramphnicol, paracetamol and allopurinol give the inhibition type competitive, with increased in K_m value to 66.6, 71.42, 52.63, 55.55, 83.33, 90.9 and100.0 mM/L respectively for inhibitors above, while the others pharmacological compounds for theophlline anhydrous, caffeine anhydrous, metronidazole and chlorpheniramine maleate, give the inhibition type of non-competitive with decreased in V_{max} values to 2173.9, 2439.0, 2000.0 and 2325.58 U/L respectively, but dexathamazone was an activator to the prolidase approximately 27.18 U/L.

Keywords: Isolation, Enzyme, Prolidase, Amniotic fluid, Inhibitors, Activators.

عزل إنزيم بروليديز من السائل الأمنيوني ودراسة صفاته الحركية وألفته تجاه المركبات الدوائية

لؤي عبد الهلالي

قسم الكيمياء/ كلية العلوم

جامعة الموصل

الموصل– العراق

Luayhelaly@uomosul.edu.iq

DOI: 10.33899/edusj.2019.162958

الاستلام	القبول
2019 / 01 / 07	2019 / 02 / 27

الملخص

تضمن البحث عزل إنزيم بروليديز من سائل الأمنيوني باستعمال التقنيات الحياتية المختلفة، اذ تم عزل قمة بروتينية واحدة بتقنية الترشيح الهلامي نوع سيفادكس G-50 ونوع سيفادكس G-100 للراسب البروتيني الناتج من عملية الترسيب بكبريتات الامونيوم (60%) بعد عملية الفرز الغشائي. وقدر الوزن الجزيئي التقريبي للإنزيم باستعمال تقنية الترشيح الهلامي نوع (G-100) التي كانت بحدود 52269.7 دالتون، وبلغت فعاليته النوعية 13516.6 وحدة إنزيم/ملغم من البروتين ذي عدد مرات تنقية وصلت 75 مرة. أظهرت النتائج أن الظروف المثلى للإنزيم المنقى من سائل الأمنيوني عند استعمال تركيز 50 مايكروغرام/مل للبروتين كمصدر للإنزيم باستعمال المحلول المنظم ترس– حامض الهيدروكلوريك بتركيز 60 ملي مول/لتر وعند أس هيدروجيني 8.0 وزمن تفاعل 32 دقيقة ودرجة حرارة 39°م. وباستعمال رسم (لاين ويفر– برك) تم إيجاد قيمة السرعة القصوى (V_{max}) وثابت ميكيلس (K_m) التي كانت مساوية لـ3448.2 وحدة إنزيم/لتر و10 ملي مول/لتر على التوالي عند استعمال مادة الأساس نوع كلايسين–برولين (Gly-Pro).

وأخيراً تم دراسة تأثير بعض المركبات الكيميائية الدوائية على فعالية الإنزيم، وبينت النتائج أن المركبات الكيميائية الدوائية من السيراميد وميتوكلوبراميد وبسيدوفيدرين وداي فيهايدرامين–هايدروكلورايد وكلورامفينكول وباراسيتامول وألوبيرانول اعطوا تثبيطاً من نوع التنافسي، الذين كانت لهم زيادة في قيمة K_m وصلت الى 66.6، 71.42، 52.63، 55.55، 83.33، 90.9، 100.0 ملي مول/لتر على التوالي للمثبطات اعلاه، اما المركبات الدوائية من نوع ثيوفيلين وكافايين وميترونيدازول وكلورفينيرامين ماليت اعطوا تثبيطاً من النوع غير التنافسي، ووصل الانخفاض في قيمة V_{max} للمثبطات من هذا النوع الى 2173.9، 2439.0، 2000.0 و 2325.58 وحدة إنزيم/لتر على التوالي، ولكن لوحظ ان الدكساثامازون منشط للإنزيم وبمقدار 27.18 وحدة إنزيم/لتر.

الكلمات المفتاحية: عزل، إنزيم، بروليديز، السائل الأمنيوني، مثبطات، منشطات.

المقدمة

يعد إنزيم البرولايديز [E.C 3.4.13.9] من إنزيمات امينوبتايديز الحاوية على وحدتين ثنائية متجانسة (والذي يعتمد في تفاعله على ايون المنغنيز ثنائي التأكسد) اذ يعمل على تحرر البرولين او هيدروكسي برولين من النهاية الكاربونية للببتيدات قليلة الوحدات Oligopeptides وقد تم التعرف عليه عام 1937[1]، اذ يعد احد الإنزيمات التي تشارك في بناء الكولاجين وله علاقة في معدلات تحولات الكولاجين[2]، والكولاجين من البروتينات المسؤولة عن الحفاظ على سلامة جميع مكونات الانسجة الضامة (الرابطة)[3]، ويدخل الكولاجين ايضا كرابط ومكون لمستقبلات لها دور مهم في نقل الاشارات التي تنظم نقل الايون وايض الدهون وتنشيط إنزيم الكاينيز والتعبير الجيني، لذلك فإن التغيير في الكمية والتركيب والتوزيع للكولاجين في الانسجة يمكن ان يؤثر على العمليات الايضية ووظائفها ونقل الاشارات بين الخلايا[4]. يتواجد إنزيم البرولايديز في اعضاء وانسجة مختلفة وله وظائف عدة على سبيل المثال تقويض البروتينات وتحولات وتنظيم بناء الكولاجين[5] وفي نمو الخلية وتنظيمها وعوامل الاستنساخ وكذلك يؤدي دوراً في عملية ألتئام الجروح وفي الالتهابات وانتشار السرطان[2]. فضلا عن ذلك فالإنزيم يشارك في عملية تنظيم انتاج جذر نيتريك اوكسايد (وهو احد المرسلات الثانوية داخل الجسم) ولذلك فإن الإنزيم له دور بارز مع العديد من الوظائف الحيوية والفسلجية نتيجة علاقته مع نيتريك أوكسايد الذي بدوره له وظائف حيوية مختلفة[4]. ان زيادة التحولات Turnover للكولاجين يمكن ان تؤدي دوراً مهماً في الفسلجة المرضية لمرض تصلب الشرايين وتطوره وغيرها من الامراض[6,5]. اذ للإنزيم دور مهم في اعادة بناء الكولاجين، وهو موجود في المخاط المعوي وانسجة الكلية والكبد والدماغ والقلب والمثانة وكريات الدم الحمر والبلازما[7]. وتزداد فعاليته عند زيادة تلف الكولاجين في اعضاء الجسم المختلفة، واشارت العديد من الدراسات علاقة الإنزيم مع بعض الامراض فعلى سبيل المثال لوحظ ان هناك علاقة بين امراض القلب الوعائية وفعالية إنزيم البرولايديز[8]. وكذلك لوحظ ان فعالية الإنزيم تزداد في سرطانات الكلية والمثانة[10,9] وان هناك علاقة عكسية بين فعالية الإنزيم مع انخفاض في مستويات مضادات الأكسدة وعلاقة طردية بين زيادة حصول حالة الكرب التأكسدي وزيادة فعالية الإنزيم[11] وبالتالي يمكن ان يحفز الكرب التأكسدي على حدوث امراض مختلفة مثل امراض القلب الوعائية خاصة لذوي السمنة[12]. وكذلك يعد الإنزيم مؤشر على حدوث مرض متلازمة المبيض المتعدد التكيسات Polycystic ovary syndrome وله علاقة طردية مع عدد التكيسات والتي يمكن ان يعد تطور المرض لرؤية المرض بشكل واضح[13]. ويعد الإنزيم كمؤشر لحدوث تليف الكبد لدى مرضى التهاب الكبد الفايروسي مع الاشارة الى أن مرض انخفاض فعالية إنزيم برولايديز يمكن ان يكون فقط في بعض الحالات الوراثية نتيجة لحدوث الطفرات الوراثية ولا يوجد علاج لهذه الحالات سوى حقن المريض بالإنزيم بعد ان يتم عزله من مصادر مختلفة[14].

علاوة على ذلك يدخل إنزيم البرولايديز في وظائف حيوية وتطبيقية اخرى اذ يدخل في عملية تحطيم المركبات السامة العضوية الفوسفاتية[15] وذلك بعملية تحلل اواصر الفوسفور–الفلور P-F والفسفور– الاوكسجين P-O [16] وكذلك يستعمل في اجهزة المتحسسات الحيوية Biosensor لتحديد نسبة المركبات العصبية السامة من المركبات العضوية الفوسفاتية مثل مركبات ثنائي ايزوبروبيل فلوروفوسفات Diisopropylfluorophosphate وسومان Soman وسارين Sarin [17]، فضلا عن استعمال الإنزيم في ازالة تلك المركبات السامة السابقة الذكر[15]، وايضا يدخل في صناعة الجبن من اجل تحسين نوعيته[18]، علاوة على ذلك، فإن الإنزيم يستعمل لأغراض علاجية في المرضى الذين لديهم نقص في هذا الإنزيم[19]. ونتيجة لجميع تلك الوظائف الحيوية والتطبيقات المختلفة للإنزيم فقد حددت اهداف هذه الدراسة الى عزل إنزيم برولايديز

من السائل الأمنيوني باستعمال تقنيات مختلفة ومن ثم دراسته من الناحية الحركية وظروف عمله المثلى وتأثير المركبات الكيميائية الدوائية عليه، إذ أن لدراسة التأثيرات التثبيطية او التنشيطية على فعالية إنزيم البرولايديز يلعب دور مهم في التحكم في وظائفه من خلال السيطرة على زيادة او انخفاض من فعاليته وزيادة استعماله في تطبيقاته فضلا عن معرفة ألفته تجاه 12 مركباً دوائياً شائعاً الاستعمال لأغراض علاجية مختلفة.

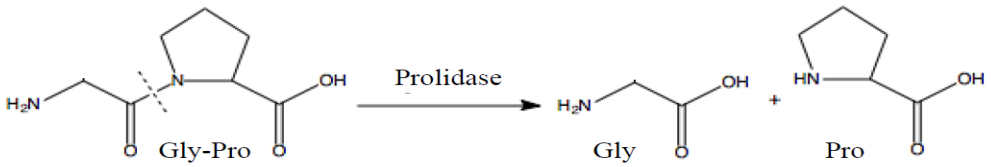
استعمل السائل الأمنيوني في عملية عزل الإنزيم كون أن الإنزيم لم يعزل في دراسات سابقة من هذا السائل فضلا عن ان هذا السائل في حالة تماس مباشر مع الجنين فهو يؤثر بشكل مباشر عليه، والسائل الأمنيوني هو سائل شفاف ذو لون مائل للاصفرار, يوجد في كيس الامنيون, ومصدر افرازه الرئيس هو بلازما دم الام, كما ينشأ من الاغشية الأمنيونية والحبل السري والمشيمة وكذلك من جلد الجنين[20], ويتكون السائل الأمنيوني من الماء اذ يشكل الماء 98% من مكوناته كما يحتوي على مواد عضوية ولا عضوية ونصف المكونات العضوية هي بروتينات والنصف الاخر يتكون من كاربوهيدرات ودهون وهورمونات وصبغات كما يحتوي على الالكتروليتات والعناصر المعدنية[21].

المواد وطرائق العمل Materials and Methods

العينة: جمعت عينات السائل الأمنيوني بحجم (220) مل من نساء الحوامل الاصحاء ظاهريا خلال فترة ما بين بداية شهر تشرين الثاني ونهاية شهر الكانون الثاني لعام 2013، بأعداد (21) عينة اثناء الولادة من مستشفى البتول التعليمي في مدينة الموصل وبإشراف اطباء مختصين، اذ تراوحت اعمارهم ما بين (16-45) سنة, وتم اخذ السائل الأمنيوني مباشرة واجريت له عملية الطرد المركزي عند سرعة 3500 x g ولمدة (30) دقيقة للحصول على السائل بشكل رائق الذي استخدم لإجراء خطوات التنقية عليه بشكل مباشر.

تقدير فعالية إنزيم برولايديز Determination of prolidase activity

تم تقدير فعالية إنزيم برولايديز حسب الطريقة المتبعة من قبل الباحث Myara واخرين[22] وكذلك الباحث Ozcan واخرين[23]، اذ يحفز إنزيم برولايديز على تحلل الاصرة الببتيدية المتكونة بين الببتيد نوع كلايسين–برولين (Gly-Pro) ليتحرر البرولين (كما موضح في المعادلة الاتية) الذي يتم تقديره باستعمال تفاعل النهايدرين[24].



تحضير الكواشف Preparation of reagents

1) محلول العمل Working solution: ويحتوي على ترس–حامض الهيدروكلوريك المنظم بتركيز 50 ملي مول/ لتر عند أس هيدروجيني 7.8 وكلوتاثايون بتركيز 1 ملي مول /لتر وكلوريد المنغنيز بتركيز 5 ملي مول/لتر و Triton-100 بتركيز 0.1%.
2) محلول مادة الاساس: ويتكون من مركب كلايسين– برولين (Gly-Pro) بتركيز 44 ملي مول/لتر.
3) محلول الكلوتاثايون بتركيز 29.93 ملي مول.
4) محلول ثلاثي كلورو حامض الخليك بتركيز 0.45 مول/لتر.

طريقة العمل Procedure

تم وضع طريقة العمل لتقدير فعالية إنزيم بروليديز كما في الجدول الآتي:

محلول الاختبار Test solution	محلول البلانك Blank solution	المحاليل المستخدمة
1 mL	1 mL	محلول العمل Working solution
200 µL	-	السائل الأمنيوني Amniotic fluid
-	200 µL	ماء مقطر D.W
مزج وحضن لمدة ثلاث ساعات عند 37 درجة مئوية		
200µL	200µL	محلول مادة الاساس بتركيز 44 ملي مول/لتر.
مزج وحضن في الحمام المائي لمدة 30 دقائق عند 37 درجة مئوية		
1 mL	1 mL	محلول ثلاثي كلورو حامض الخليك بتركيز 0.45 مول /لتر

مزجت الأنابيب ووضعت في جهاز الطرد المركزي عند 700 x g لمدة 5 دقائق، ومن ثم تم أخذ 1 مل من الراشح لحساب تركيز البرولين باستعمال كاشف النهايدرين. –إذ أن وحدة الإنزيم تعرف بأنها عبارة عن كمية الإنزيم التي تحول مايكرومول واحد من مادة الاساس كلايسين– برولين الى برولين لكل دقيقة لكل مليلتر تحت الظروف المحددة للقياس.

خطوات عزل إنزيم بروليديز من السائل الأمنيوني ودراسته:

1. **ترسيب البروتين بالإزاحة الملحية Protein precipitation by salting out:** استعملت كبريتات الامونيوم الصلبة لترسيب البروتين من السائل الأمنيوني بطريقة الإزاحة الملحية وبدرجة تشبع 60% ولحجم 220 مل من السائل الأمنيوني اذ استعمل هذا النوع من الملح لترسيب نفس الإنزيم من قبل الباحثين لفصل الإنزيم من البكتيريا[25] ولفصل الإنزيم من نسيج دماغ الماعز[26]، اذ اضيف الملح بصورة تدريجية مع التحريك المستمر بالمحرك المغناطيسي عند درجة حرارة 4°م، ومن ثم ترك المحلول مدة 24 ساعة في الثلاجة لتترسب جميع البروتينات.

2. **فصل الراسب بالطرد المركزي المبرد Separation of the precipitation by cooling centrifuge** فصل الراسب عن السائل الرائق (الراشح) بجهاز الطرد المركزي المبرد بسرعة 9000 x g ولمدة 45 دقيقة، ثم أضيف الى الراسب المفصول اقل كمية من الماء المقطر، وبعد حساب حجم محلول الراسب البروتيني والسائل الرائق الناتج قدرت كمية البروتين بطريقة لاوري المحورة[27]، وقيست فعالية إنزيم بروليديز في كل من محلول الراسب البروتيني والسائل الرائق باستعمال طريقة الباحث Myara واخرين[22]، ومن ثم اجريت عليه الخطوة التالية من التنقية وهي عملية الفرز الغشائي.

3. **الفرز الغشائي (الديلزة) Dialysis:** أستخدم الراسب الذي كان بحجم (33.5 مل) والناتج من الخطوة (2) لإجراء عملية الفرز الغشائي عليه وباستعمال محلول بيكاربونات الامونيوم (NH_4HCO_3) بتركيز 0.1 مول[28] وذلك لتجنب تأثير دونان Donnan، اذ استعملت عملية الفرز الغشائي لإزالة كل البروتينات والببتيدات التي لها أوزان جزيئية اقل من 14000 دالتون وكذلك ايونات ملح كبريتات الامونيوم الناتج من عملية الترسيب. تمت عملية الديلزة عند درجة حرارة 4°م مع التحريك بالمحرك المغناطيسي مع ضرورة تبديل

محلول بيكاربونات الامونيوم لثلاث مرات واستمرت العملية لمدة 24 ساعة. وبعد الانتهاء من عملية الفرز الغشائي تم حساب الحجم النهائي للمحلول الناتج وتقدير كمية البروتين بطريقة لاوري المحورة إضافة الى تقدير فعالية إنزيم بروليديز ثم حفظ المحلول في درجة −20°م لحين الاستعمال.

4. **كروماتوغرافيا الترشيح الهلامي باستعمال سيفادكس G-50:** استعمل عمود الفصل ذو الأبعاد (2×90) سم والذي يحتوي على هلام السيفادكس من نوع G-50 (Sephadex G-50) المخصص لفصل المركبات ذات الأوزان الجزئية لغاية 30 كيلو دالتون[29] وبالتالي التخلص من هذه المركبات التي لا نحتاجها في الدراسة الحالية. وبلغ ارتفاع الهلام في العمود 85 سم، تم حقن العمود بكمية 4 مل من المحلول الناتج من عملية الديلزة (الخطوة رقم 3) وقد ظهرت لدينا حزمة واحدة (الحزمة A) التي لديها أعلى فعالية نوعية للإنزيم (الشكل 1).

5. **تقنية التجفيد Lyophilizer:** تم تجفيد الحزمة البروتينية التي أظهرت فعالية نوعية عالية للإنزيم والناتجة من عمود الفصل نوع Sephadex G-50 الى ثلث حجمها، ثم أخذت العينة وحفظت عند درجة حرارة −20°م حتى يتم تهيئتها للخطوة التالية.

6. **كروماتوغرافيا الترشيح الهلامي باستعمال سيفادكس G-100:** استعمل عمود الفصل ذو الأبعاد(2×90)سم والذي يحتوي على هلام السيفادكس من نوع G-100 (Sephadex G-100). اذ بلغ ارتفاع الهلام في العمود 85 سم، وحدد حجم الروغان للمواد القياسية التي حقنت في العمود لغرض تحديد صفات العمود وإيجاد منحني قياسي لتحديد الوزن الجزيئي التقريبي (للحزمة البروتينية ذات الفعالية العالية الناتجة من حقن المواد في عمود الفصل والتي حددت حجوم روغانها أيضاً) من خلال رسم العلاقة الخطية بين حجوم روغانها ولوغاريتم أوزانها الجزيئية المعلومة [30].

المواد والمحاليل المستعملة في اعمدة الفصل (سيفادكس G-50 وسيفادكس G-100): المحلول المنظم نوع ترس−حامض الهيدروكلوريك ذو أس هيدروجيني 8 وبتركيز 10 ملي مول/لتر، المحلول البروتيني (للراسب) الناتج من الخطوة رقم 3 (تستعمل في عمود الفصل الاول)، المحلول البروتيني الناتج من الخطوة رقم 5 (تستعمل في عمود الفصل الثاني)، الحامض الاميني التربتوفان (Trp) لحساب الحجم الداخلي للعمود (V_i) Internal volume، الدكستران الأزرق Blue dextran لحساب الحجم الخارجي للعمود (V_o) Void volume ومواد قياسية مستعمال لتحديد الوزن الجزيئي لإنزيم بروليديز (إنزيم الهكسوكاينيز Hexokinase، إنزيم الفا−اميليز α-amylase، ألبومين مصل البقر Bovine serum albumin (BSA)، ألبومين البيض Egg albumin، الببسين Pepsin والبابين Papain). حضرت المحاليل القياسية بإذابة 0.1 غرام (من المواد القياسية) في 10 مل من الماء المقطر ومن ثم أجريت عملية حقن المواد القياسية المذكورة آنفاً بحجم 3مل في عمود الفصل وعلى جدران عمود الفصل تبعها الغسل بالمحلول المنظم عند اس هيدروجيني 7 والذي استعمل أيضاً كمحلول روغان Elution solution. أجريت عملية الجمع من العمود الأول بمعدل جريان 75مل/ساعة وبفاصل زمني مقداره ثلاث دقائق لكل جزء، اما للعمود الثاني فقد كانت عملية الجمع بمعدل جريان 62 مل/ساعة وبفاصل زمني مقداره 5 دقائق لكل جزء باستعمال جهاز جامع الأجزاءFraction collector. تمت متابعة المحتوى البروتيني من خلال قياس الامتصاصية للأجزاء المفصولة بجهاز المطياف الضوئي نوع (UV-Vis Spectrometer-PD 303UV) عند طول موجي 280 نانومتر. فضلاً عن متابعة فعالية إنزيم بروليديز

في كل جزء من الأجزاء المفصولة باستعمال طريقة الباحث (Myara) واخرين [22]، ومن ثم جمعت الأجزاء البروتينية الحاوية على أعلى فعالية للإنزيم.

7. **تقنية التجفيد Lyophilizer**: تم تجفيد الحزمة البروتينية الناتجة ذات أعلى فعالية نوعية لإنزيم برولايديز من عمود الفصل الثاني (Sephadex G-100) (الشكل 2)، وبعد الحصول على الإنزيم بهيأة صلبة حفظت بدرجة −20 °م لحين استعماله في الخطوة اللاحقة في حساب الوزن الجزيئي للإنزيم ودراسة فعالية الإنزيم لغرض تحديد الظروف المثلى التي يعمل بها الإنزيم المفصول من السائل الأمنيوني وهي تركيز الإنزيم وتركيز المحلول المنظم المستعمل وتركيز مادة الأساس والأس الهيدروجيني وزمن ودرجة حرارة التفاعل فضلا عن دراسة تأثير المركبات الكيميائية الدوائية على الإنزيم.

التأثير التثبيطي او التنشيطي للمركبات الكيميائية الدوائية

استعملت طريقة الباحث (Befani) واخرين[31] في اختبار امكانية تأثير المركبات الكيميائية الدوائية على فعالية إنزيم البرولايديز بعد عملية التنقية الاخيرة، وكذلك دراسة نوعية التثبيط باستعمال تراكيز مختلفة من المواد الكيميائية على التفاعل الإنزيمي المحدد لقياس فعالية الإنزيم بعد تحديد الظروف المثلى عليه.

النتائج والمناقشة

تشير النتائج الموضحة في الجدول(1) الى إن الفعالية النوعية للإنزيم ارتفعت الى قيمة (518.73 وحدة إنزيم/ملغم بروتين) خلال عمليات التنقية للراسب الناتج من عملية الترسيب مقارنة بفعالية الإنزيم في السائل الأمنيوني (الخام) (179.93 وحدة إنزيم/ملغم بروتين)، كما ارتفعت أكثر بعد عملية الفرز الغشائي (الديلزة) وذلك بسبب إزالة المركبات البروتينية ذات الأوزان الجزئية الصغيرة (التي تقل عن 14000 دالتون)[32] ووصلت الى (1017.76 وحدة إنزيم/ملغم بروتين) وكذلك ازدادت بعد استعمال عمودين من أعمدة الفصل، الأول نوع سيفاديكس G-50 والثاني نوع سيفاديكس G-100 لفصل المركبات ذات الأوزان الجزيئية المختلفة للحصول على نقاوة عالية للإنزيم وصلت (75) مرة. اذ تم الحصول على تلك النقاوة من عملية جمع أعلى القمة للإنزيم ذات الفعالية العالية والكمية القليلة للبروتين.

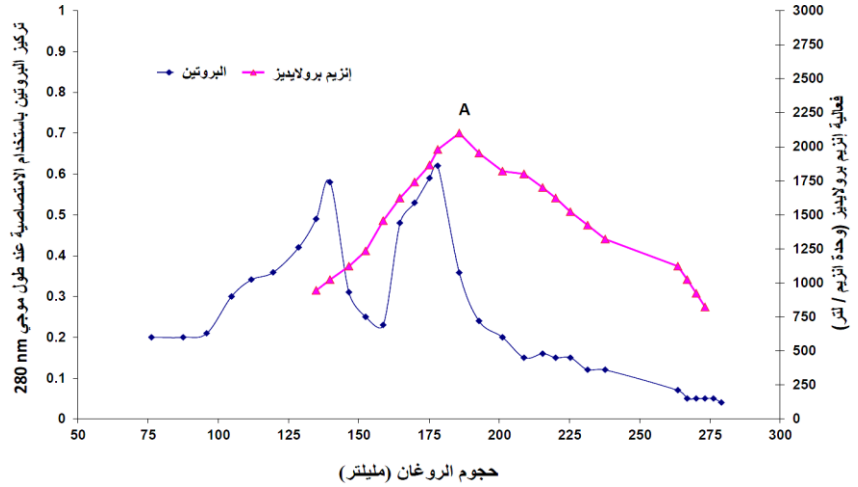
الجدول 1: خطوات تنقية إنزيم برولايديز من سائل الأمنيوني الإنسان.

خطوات التنقية	الحجم (مل)	تركيز البروتين (ملغم/مل)	الفعالية للإنزيم (*وحدة إنزيم/مل)	الفعالية الكلية (وحدة إنزيم)	الفعالية النوعية (وحدة إنزيم/ملغم بروتين)	عدد مرات التنقية	الاستعادة %
السائل الأمنيوني	220	2.89	520	114400	179.93	1	100
الترسيب بكبريتات الامونيوم 60%	33.5	4.11	2132	71422	518.73	3	62.4
الراشح	190.0	0.81	213.5	40565	263.58	1	35.5
الديلزة للراسب	35.5	1.97	2005	71177.5	1017.76	6	62.2
القمة A الناتجة من عمود الفصل الترشح الهلامي سيفادكس G-50	30.4	0.67	2100	63840	3134.3	17	55.8
القمة A الناتجة من عمود الفصل الترشح الهلامي سيفادكس G-100	17.7	0.18	2433	43064.1	13516.66	75	37.6

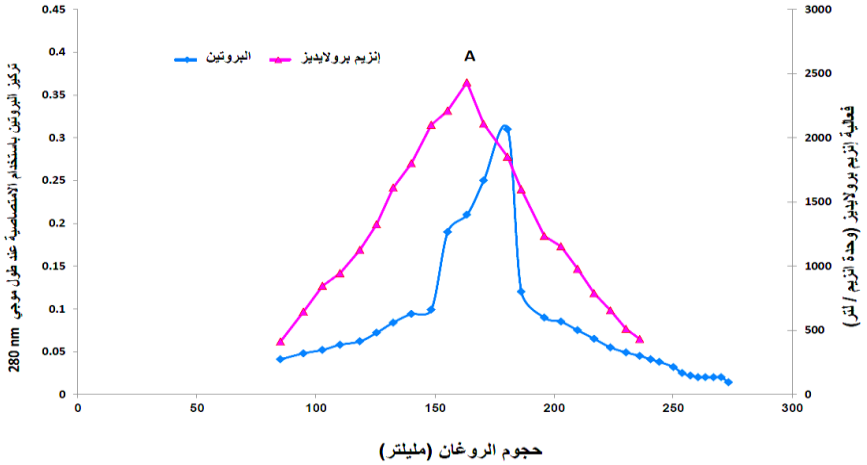
* وحدة الإنزيم: هي عبارة عن كمية الإنزيم التي تحول مايكرومول واحد من مادة الاساس (Gly-Pro) الى برولين لكل دقيقة لكل مليلتر تحت الظروف المحددة للقياس.

كروماتوغرافيا الترشيح الهلامي:

استعملت هذه التقنية في عملية فصل المركبات البروتينية التي تم الحصول عليها من الترسيب بكبريتات الامونيوم (بعد أن اجري لها عملية الفرز الغشائي). وقد استعمل فيها عمود الفصل الحاوي على هلام السيفادكس نوع G-50 (Sephadex G-50) ثم بعد ذلك عمود الفصل الحاوي على هلام السيفادكس نوع G-100 (Sephadex G-100) وقد لوحظت حزمة واحدة ذات فعالية عالية للإنزيم لعمود الفصل (نوع G-50) (الشكل 1) وكانت القمة عند حجم روغان 164.7مل (وان حجم الروغان لبداية ظهور حزمة فعالية الانزيم ونهايتها كان ما بين 135–173مل) والفعالية النوعية لها كانت 3134.3 وحدة إنزيمية/ملغم بروتين وعدد مرات التنقية 17 مرة مقارنة بالإنزيم الخام (الجدول 1)، ثم حقنت القمة الأولى في العمود الثاني المحتوي على هلام نوع سيفادكس G-100 اذ ان روغان المحاليل البروتينية أعطى حزمة بروتينية واحدة وكانت القمة ذات الفعالية العالية عند حجم روغان 163.5 مل (وان حجم الروغان لبداية ظهور حزمة فعالية الانزيم ونهايتها لهذا العمود كان ما بين 85–236 مل) ومن خلال متابعة فعالية الإنزيم اذ جد ان الفعالية النوعية للإنزيم هي 13516.66 وحدة إنزيمية/ملغم بروتين وعدد مرات التنقية 75 مرة مقارنة بالإنزيم الخام والتي استعملت فيما بعد لتقدير الوزن الجزيئي (الجدول 2).



الشكل 1: المظهر الجانبي لروغان الحزمة البروتينية لإنزيم بروليديز الناتجة من عمود الفصل نوع Sephadex G-50 العائدة لسائل الأمنيوني بواسطة تقنية الترشيح الهلامي.



الشكل 2: المظهر الجانبي يبين روغان الحزمة البروتينية لإنزيم بروليديز الناتجة من عمود الفصل Sephadex G-100 والعائدة لسائل الأمنيوني بواسطة تقنية الترشيح الهلامي.

تقدير الوزن الجزيئي التقريبي لإنزيم البروليديز بتقنية الترشيح الهلامي :

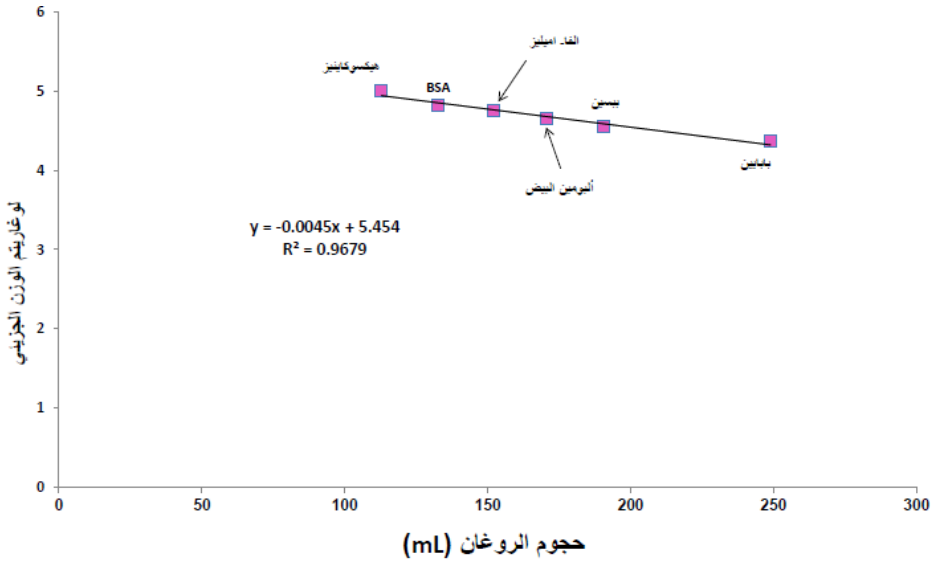
قدر الوزن الجزيئي التقريبي للحزمة البروتينية الناتج من عمود الفصل باستعمال تقنية الترشيح الهلامي للعمود الاخير من نوع Sephadex G-100، اذ أعطى عمود الفصل هذا أعلى فعالية للإنزيم وذات نقاوة وصلت الى (75) مرة لذلك تم استعمالها في تقدير الوزن الجزيئي للإنزيم من خلال إمرار عدد من المركبات معلومة الوزن الجزيئي والتي تتراوح أوزانها الجزيئية بين (204 – 2000000 دالتون) على عمود الفصل لغرض تعيين خواص العمود من حيث الحجم الداخلي (V_i) وكذلك الحجم الخالي أو الفارغ من الحبيبات (V_o)، والجدول (2) يبين المواد التي تم إمرارها على عمود الفصل الحاوي على هلام (Sephadex G-100) مع أوزانها الجزيئية وحجوم روغانها. وعند رسم حجم الروغان لكل مادة مقابل لوغاريتم وزنها الجزيئي ظهر خط مستقيم كما يلاحظ في الشكل (3) والذي حدد من خلاله الوزن الجزيئي التقريبي لإنزيم البروليديز المعزول من السائل الأمنيوني والذي بلغ 52269.7 دالتون (الجدول 2).

ان إنزيم بروليديز اجريت له عمليات تنقيته من مصادر مختلفة لأنسجة مختلفة من الانسان[34,33] ولكن لم نلاحظ ان هناك عزل للإنزيم من السائل الأمنيوني. وقد لوحظ ان الإنزيم المعزول من كريات دم الحمر الانسان له وزن جزيئي بلغ 55000 دالتون[35]، اما الوزن الجزيئي للإنزيم المعزول من بكتريا نوع *Aureobacterium esteraromaticum* كان بمقدار 44000 دالتون بتقنية الترشيح الهلامي، وبوزن جزيئي ما يقارب 40000 دالتون عند تقديره بواسطة جهاز الهجرة الكهربائية SDS PAGE وللمصدر نفسه[36]. فضلا عن ذلك فقد لوحظ ان هناك قمتين عند فصل إنزيم البروليديز من بروستات الانسان، وان للإنزيم ايزومرين ولهم اوزاناً جزيئية تقارب 110000 و165000 دالتون على التوالي باستعمال تقنية الترشيح الهلامي[37]. وان الجين المسؤول عن الإنزيم يقع في الكروموسوم رقم (19) وله القدرة على تشفير 493 حامض اميني ذو وزن جزيئي 54000 دالتون[38]. فضلا عن ذلك فقد لوحظ ان الوزن الجزيئي للإنزيم المعزول من بكتيريا نوع *Xanthomonas maltophilia* بلغ 51000 دالتون[25] وهو مقارب لما وجدناه في دراستنا الحالية.

الجدول 2: الاوزان الجزيئية وحجوم روغان المواد القياسية المستعملة في تقنية الترشيح الهلامي باستعمال هلام نوع Sephadex G-100 .

أسم المادة القياسية	الوزن الجزيئي (دالتون)	حجم الروغان (مل)
الدكستران الأزرق Blue dextran (الحجم الخالي V_o)	2000000	99
هيكسوكاينيز Hexokinase	100000	126
ألبومين مصل البقر Bovine serum albumin	67000	160
الفا–اميليز α – amylase	58000	172
ألبومين البيض Egg albumin	45000	216
الببسين Pepsin	36000	244
البابين Papain	21000	280
التربتوفان Tryptophan (الحجم الداخلي V_i)	204	437
المجهول (القمة A ذات فعالية عالية)	52269.7	*163.5

* أخذت هذه القيمة من الشكل رقم (2) الذي يظهر فيه حجم روغان القمة المفصولة للإنزيم من سائل الأمنيوني بواسطة تقنية الترشيح الهلامي لعمود الفصل G-100.



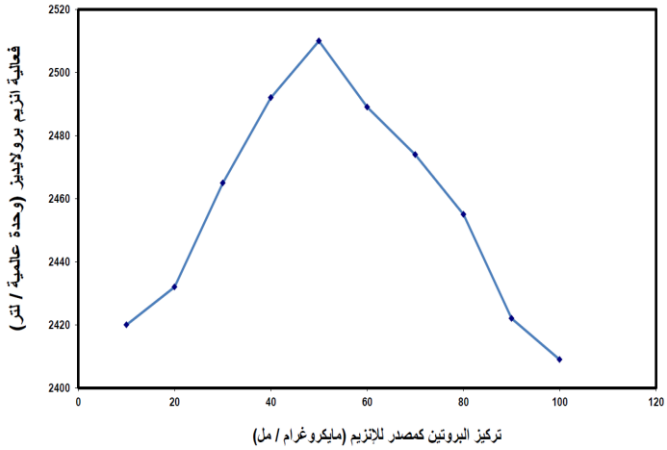
الشكل 3: المنحني القياسي لتحديد الوزن الجزيئي بتقنية الترشيح الهلامي باستعمال عمود الفصل نوع Sephadex G-100.

دراسة العوامل المؤثرة على فعالية إنزيم بروليديز المعزول من السائل الأمنيوني:

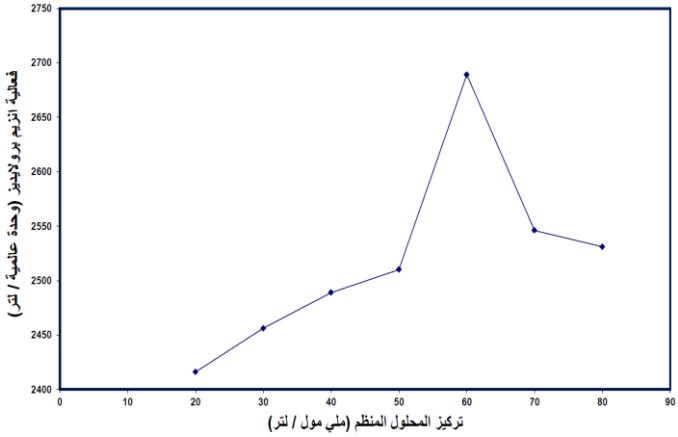
تكون التفاعلات التي تحفزها الإنزيمات حساسة للظروف الخارجية مثل كل التفاعلات الكيميائية الاخرى, وهكذا فان تركيز الإنزيم وتركيز مادة الأساس ودرجة الحرارة والأس الهيدروجيني (pH) تؤثر على معدل سرعة التفاعل الإنزيمي لان جميع هذه العوامل تؤثر على الموقع الفعال للإنزيم وتؤثر على تكوين معقد الإنزيم والمادة الأساس[30] ولغرض التعرف على فعالية الإنزيم بصورة دقيقة يكون من الضروري دراسة العوامل المؤثرة على فعالية الإنزيم المنقى جزئيا وإيجاد الظروف المثلى التي يعمل بها الإنزيم. اذ لوحظ من دراسات سابقة أن إنزيمات البروليديز تختلف بشكل رئيس حسب خصوصية مواد الاساس واحتياجها الى المعادن ودرجة الحرارة المثلى والاس الهيدروجيني، وبشكل عام فإن معدل الاس الهيدروجيني للإنزيم يكون مختلفاً بحسب مصدره ولكن يمكن ان يكون ما بين 6–8 وان القيمة المثلى للإنزيم تعتمد على المصدر الذي عزل منه الإنزيم، وان درجة الحرارة المثلى لها يمكن ان تكون ما بين 35–55°م للإنزيم البروليديز المشتق من مصادر ذات الحرارة المعتدلة Mesophilic بينما الإنزيم المعزول من مصادر ذات الحرارة المفرطة *Hyperthermophilic archaea* مثل بكتريا نوع *Pyrococcus spp.* نلاحظ انها تعطي اعلى فعالية عند 100°م[39].

1. **تأثير تركيز الإنزيم:** تم تقدير فعالية إنزيم بروليديز بوجود تراكيز مختلفة من الإنزيم المنقى جزئياً من سائل الأمنيوني تتراوح ما بين (50– 800 مايكروغرام/مل) مع توفر المادة الأساس، ويبين الشكل (4) العلاقة بين فعالية الإنزيم وتركيز البروتين كمصدر للإنزيم بثبوت العوامل الأخرى, اذ يلاحظ ان سرعة التفاعل الإنزيمي تزداد بزيادة تركيز الإنزيم المنقى الى حد 50 مايكروغرام/مل ثم انخفض وعليه اعتمد هذا التركيز باعتباره التركيز المثالي للإنزيم واستعمل في جميع التجارب اللاحقة.
2. **تأثير تركيز المحلول المنظم المستعمل:** تمتاز المحاليل المنظمة بكونها مقاومة للتغير في تركيز ايون الهيدروجين عند اضافة كميات قليلة من حامض او قاعدة الى المحلول وتعد معرفة تركيز المحلول المنظم ضرورية لقياس فعالية الإنزيمات, وتم استعمال تراكيز مختلفة من المحلول المنظم تتراوح ما بين (20– 80 ملي مول/لتر) نوع ترس– حامض الهيدروكلوريك وبأس هيدروجيني 7.8 وبينت النتائج ان

الفعالية المثالية للإنزيم بروليديز المعزول كانت عند تركيز (60 ملي مول/لتر) من المحلول المنظم وكما مبين في الشكل (5).



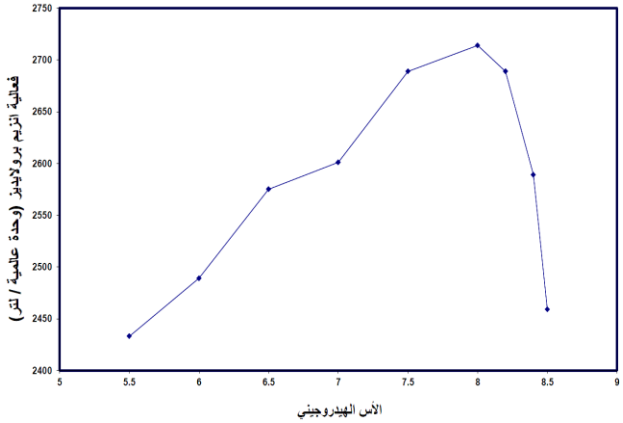
الشكل 4: تأثير التراكيز المختلفة من البروتين المنقى كمصدر للإنزيم على الفعالية.



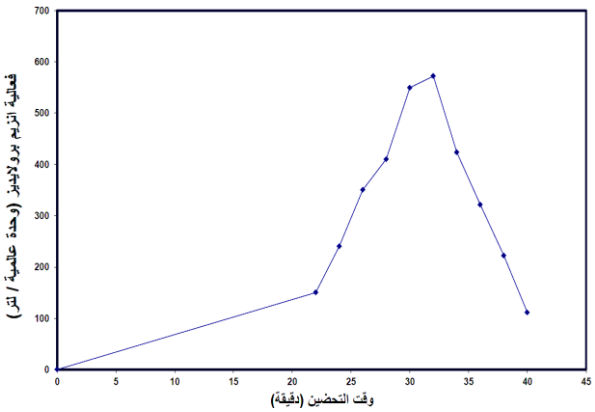
الشكل 5: تأثير التراكيز المختلفة للمحلول المنظم على فعالية إنزيم بروليديز المعزول .

3. **تأثير الأس الهيدروجيني (pH):** تم تقدير فعالية إنزيم بروليديز في محلول المنظم نوع ترس– حامض الهيدروكلوريك بتركيز (60 ملي مول/لتر) مع تغير الأس الهيدروجيني للمحلول المنظم ما بين (5.5–8.5) لغرض ايجاد فعالية الإنزيم المثلى وتشير النتائج الموضحة في الشكل (6) ان أعلى فعالية للإنزيم كانت عند اس هيدروجيني 8.0 . في دراسة سابقة لوحظ أن للإنزيم العزول من نسيج دماغ الجرذان قيمة اس هيدروجيني مثلى عند 7.6–8 [40]. ولوحظ أن الإنزيم المنقى من بكتيريا نوع *Xanthomonas maltophilia* يكون مستقراً بأعلى فعالية عند اس هيدروجيني 7.5 [25]، فضلا عن ذلك فقد اشارت دراسة اخرى الى أن عمليات تحلل المائي للبرولين وهيدروكسي برولين بواسطة الإنزيم يعمل بشكل مثالي عند اس هيدروجيني 9 للإنزيم المفصول من بكتريا نوع *Aureobacterium esteraromaticum* [36].

4. **تأثير زمن التفاعل:** تمت دراسة زمن التفاعل ما بين (0– 40 دقيقة) لاختيار الفترة الزمنية المثلى لعمل الانزيم اذ تشير النتائج الموضحة في الشكل (7) إن أعلى فعالية للإنزيم كانت عند 32 دقيقة بينما وجد الباحث (Fujii) واخرين[36] ان زمن التفاعل الامثل للإنزيم المعزول من بكتيريا نوع *Aureobacterium esteraromaticum* كان عند مرور فقط 10 دقائق.

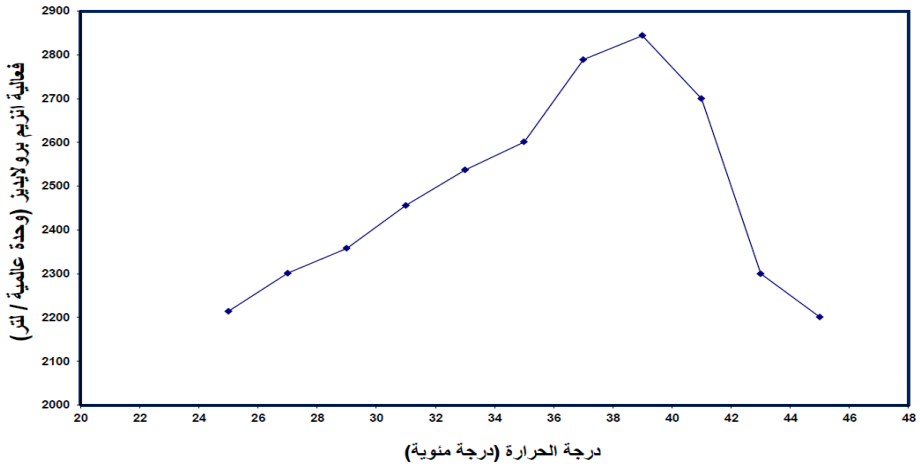


الشكل 6: تأثير الأس الهيدروجيني على فعالية إنزيم بروليديز .



الشكل 7: تأثير زمن التفاعل على فعالية إنزيم بروليديز.

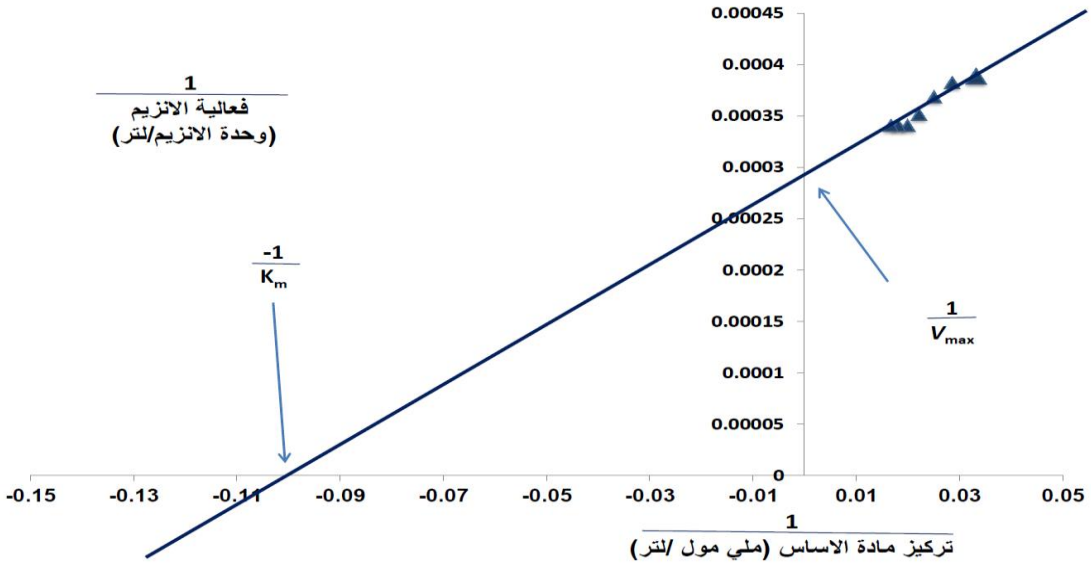
5. **تأثير درجة الحرارة:** تم قياس فعالية إنزيم بروليديز في درجات حرارية مختلفة تتراوح ما بين (25–45°م) وكما هو موضح في الشكل (8) اذ يلاحظ من الشكل ان الارتفاع التدريجي لدرجة الحرارة يؤدي الى رفع فعالية الإنزيم تدريجياً الى حد (39°م) يحصل بعدها انخفاض في فعالية الإنزيم لذا اعتمدت هذه الدرجة كدرجة الحرارة المثلى للإنزيم في التجارب اللاحقة. اذ ان التفاعلات التي تحفزها الإنزيمات تتأثر بدرجات الحرارة ولذلك يلاحظ ازدياد معدل سرعة التفاعل المحفز بالإنزيم كلما ازدادت درجة الحرارة وعند استعمال درجات حرارة اعلى من درجة الحرارة المثلى (وهي درجة الحرارة التي يبدي عندها الإنزيم اعلى فعالية له) يحصل انخفاض في معدل سرعة التفاعل بسبب حصول مسخ في طبيعة الإنزيم نتيجة لتفكك الأواصر الهيدروجينية والقوى الأخرى المسؤولة عن المحافظة على التركيب الثلاثي للبروتين ومن ثم فقدان الفعالية[32]، وان درجة الحرارة هذه هي الدرجة المثلى التي تم الحصول عليها مقاربة لما وجده الباحث (Suga) واخرين[25] عند عملية تنقية الإنزيم من بكتيريا *Xanthomonas maltophilia* التي كانت عند 37°م. بينما كانت درجة الحرارة المثلى عند 45°م للإنزيم المفصول من بكتيريا نوع *Aureobacterium esteraromaticum*.[36]



الشكل 8: تأثير درجة الحرارة على فعالية إنزيم بروليديز.

6. **تأثير تركيز مادة الأساس من الببتيد نوع كلايسين– برولين:** يطلق على أعلى سرعة للتفاعل الإنزيمي بالسرعة القصوى (V_{max}) [30] ولمعرفة العلاقة بين إنزيم البروليديز وتركيز المادة الأساس تم قياس فعالية الإنزيم بوجود تراكيز مختلفة من مادة الأساس كلايسين–برولين (Gly-Pro) والتي تراوحت ما بين (30–65 ملي مول/لتر)، والشكل (9) يبين ان سرعة التفاعل الإنزيمي تزداد بزيادة تركيز المادة الأساس حتى وصلت الى قيمة توقفت بعدها الزيادة في سرعة التفاعل الإنزيمي وبذلك يمكن تحديد تركيز المادة الأساس اللازمة للوصول الى السرعة القصوى (V_{max}) للتفاعل الإنزيمي وهذا مطابق لما اثبته العالمان (مكيلس ومنتن)، اذ أوضحا ان استعمال تراكيز واطئة من مادة الأساس يجعل المواقع الفعالة للإنزيم غير مشبعة بالمادة الأساس لكن عند زيادة تركيز مادة الأساس بشكل كبير تصبح المواقع الفعالة للإنزيم مشبعة بمادة الأساس اي عندما يتم التوصل الى السرعة القصوى للتفاعل بعد التركيز هذا فأن سرعة التفاعل الإنزيمي تكون غير معتمدة على تركيز المادة الأساس[32] وبتطبيق علاقة لاينويفر–برك (Line Weaver-Burk plot) وجد ان قيمة السرعة القصوى (V_{max}) وثابت مكيليس (K_m) لإنزيم البروليديز كانت مساوية لـ

3448.2 وحدة إنزيم/لتر و10 ملي مول/لتر على التوالي وكما هو موضح في الشكل (9). لوحظ في دراسات سابقة ان قيمة ثابت مكيليس (K_m) 178 مايكرومول وقيمة السرعة القصوى (V_{max}) 601 مايكرومول لكل دقيقة لكل ملغم من البروتين للإنزيم المعزول من امعاء الجرذان[41].



الشكل 9: رسم لاينويفر – برك لتحديد قيمتي السرعة القصوى(V_{max}) وثابت ميكيلس (K_m) لإنزيم بروليديز.

7. تأثير المركبات الكيميائية الدوائية على فعالية إنزيم بروليديز:

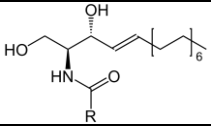
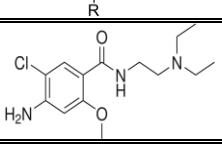
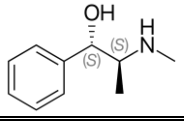
يوجد عدد من المركبات الكيميائية التي تعمل تأثير على فعالية إنزيم بروليديز إما أن تقلل او تزيد من سرعة التفاعل الإنزيمي وقد تم استعمال عدد من المركبات الكيميائية الدوائية لمعرفة تأثيرها على فعالية الإنزيم المعزول من السائل الأمنيوني، واستعملت الظروف المثلى المحددة مسبقا لدراسة تأثير المركبات الكيميائية المختلفة على فعالية الإنزيم فقد لوحظ ان لظروف الإنزيم السابقة الذكر من الاس الهيدروجيني وغيرها التأثير على فعالية الإنزيم من خلال تثبيط او تنشيط التفاعل الإنزيمي[42]. اذ تم استعمال عدد من الأدوية النقية المحددة (لا تحوي اي مضافات عليها) واستحصلت من الشركة العامة لصناعة الأدوية, ومن شركة الحكماء لصناعة الأدوية والمستلزمات الطبية في محافظة نينوى لمعرفة تأثيرها على فعالية إنزيم بروليديز، ويوضح الجدول رقم (3) النتائج التي تم الحصول عليها من خلال استعمال تراكيز مختلفة مقاربة ضمن تركيز مادة الاساس التي تم الحصول عليها عند تحديد الظروف المثلى للإنزيم وهي (5 و10 و15 ملي مول/لتر) لجميع تلك المواد الكيميائية الدوائية وحسب طريقة الباحث (Befani) واخرين[31]، فقد اشارت النتائج الى ان هناك نسباً مختلفة لفعالية الإنزيم المفصول من السائل الأمنيوني مقارنا بفعالية الإنزيم التي تم الحصول عليها في الفقرة (تأثير تركيز مادة الأساس من كلايسين– برولين)، وكما هو معلوم لكل دواء مستعمل له تأثيرات علاجية مختلفة على الجسم، فعلى سبيل المثال هناك أدوية تستخدم كمضادات حيوية مثل (السيراميد Ceramide وفلاجيل Flagyl) او منشط للنظام العصبي المركزي ومنشط ايضي مثل الكافايين او مسكن للآلام المختلفة مثل الباراسيتامول وبسيدوفيريدين Psedophedrine وثايوفلين اللامائي Theophyllin anhydrous الذي يعد من مجموعة الزانثات Xanthes ويثبط الناقلات العصبية ويستعمل في علاج الربو والكلورفينيرامين ماليت Chlorpheniramine-maleate وهو مضاد الهستامين يستعمل لحالات تحسس الجهاز التنفسي العلوي التي

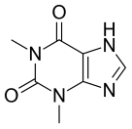
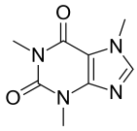
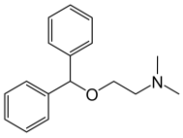
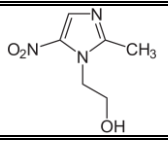
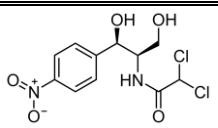
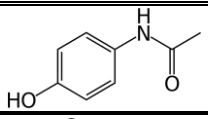
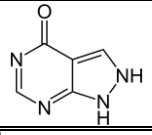
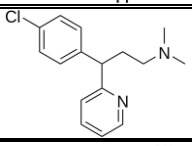
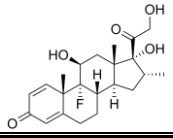
تتضمن الجيوب الانفية[43] والداي فينهايدرامين- هايدروكلورايد في Diphenhydramine-HCl الذي يستعمل لعلاج التهاب البنكرياس[44] والميتوكلوبراميد – هايدروكلورايد Metoclopramide-HCl يستعمل في الاضطرابات الهضمية لتخفيف ومنع الغثيان والاقياء بعد العمليات الجراحية[46]، كما تم دراسة تأثير الدكساميثازون وهو دواء ينتمي الى فئة الأدوية الهورمونية الستيرويدية وهو مضاد للالتهابات[52].

اوضحت النتائج في الجدول رقم (3) الى ان هناك تثبيط لفعالية الانزيم عند استعمال المركبات الكيميائية الدوائية المختارة وبنسب مختلفة عند استعمال التراكيز (5، 10، 15 ملي مول/لتر) مقارنة مع الفعالية القياسية الاخيرة للإنزيم وهي 3448.2 وحدة عالمية /لتر.

اذ لوحظ ان هناك العديد من المركبات الدوائية لها تأثير انخفاضي لفعالية إنزيم البروليديز وبنسب مختلفة وكانت اعلى نسبة مئوية لانخفاض فعالية الانزيم كان لمركبي باراسيتامول والالوبيورانول (الجدول 3) وهذا يمكن الاستفادة منه في تقليل من حدوث بعض الامراض او مضاعفاتها التي تزيد من تليف الانسجة مثل تليف الكبد او تقليل من حدوث عملية تصلب الشرايين ولكن بالمقابل يمكن ان يؤثر على الوظائف الحيوية الفسلجية المختلفة داخل الجسم، ولقد لوحظ ان هناك حالة مرضية نادرة يمكن ان تؤدي الى انخفاض في فعالية الإنزيم في الجسم والذي من الممكن ان يؤثر على النسيج الرابط ومن اعراضه الآفات الجلدية والتخلف العقلي والتهابات الجهاز التنفسي المتكررة وقد لوحظ ان الإنزيم المنقى من مصادر مختلفة من الممكن ان يحل محل بعض العلاجات[16] فضلا عن ذلك فأن تجنب بعض الادوية التي يمكن ان تزيد من انخفاض فعالية الانزيم لتقليل من التأثير على الجسم، لوحظ في دراسات سابقة ان هناك بعض الأدوية غير الستيرويدية المضادة للالتهابات مثل استيل حامض السلسليك Acetyl-salicylic acid وسلسيليت الصوديومSodium salicylate وفينايل بيوتازون Phenylbutazone واندوميثاسين Indomethacin لها دور في تثبيط العمليات الايضية للكولاجين خلال تثبيط فعالية إنزيم البروليديز في بناء الكولاجين في الخلايا[48,47]. وكذلك هناك تثبيط للإنزيم من خلال الأدوية التي تشابه مادة الاساس مثل باستراسين Bacitracin والبيورومايسين Puromycin [40]. وفي دراسة اخرى لوحظ ان الكلورافينيكول يعمل على التثبيط بشكل قليل لعملية بناء الكولاجين وبالتالي تقليل من فعالية الإنزيم[49] وهذا مطابق لما وجدناه في دراستنا الحالية. فضلا عن ذلك فقد لوحظ ان دواء دايونوربيسين Daunorubicin يعمل على التثبيط من فعالية إنزيم البروليديز[50].

الجدول 3: تأثير بعض المركبات الكيميائية الدوائية على فعالية إنزيم بروليديز .

الرقم	المركبات الكيميائية الدوائية	التركيب الكيميائي للمركبات الكيميائية الدوائية	تركيز المركب الدوائي (ملي مول/لتر)	فعالية الإنزيم بروليديز (وحدة عالمية/لتر)	*النسبة المئوية للتثبيط (-) والتنشيط(+)
1	**سيراميد يفضل تنشيط Ceramide**		5	1721.2	-50.08
			10	1697.3	-50.77
			15	1600.8	-53.57
2	**ميتوكلوبراميد Metoclopramide**		5	1763.5	-48.85
			10	1600.23	-53.59
			15	1500.8	-56.47
3	**بيسيدوفيدرين Pseudoephedrine**		5	1827.6	-46.99
			10	1785.7	-48.21
			15	1745.3	-49.38

4	ثيوفيلين اللامائي Theophlline anhydrous		5	2123.3	-38.42
			10	2012.5	-41.63
			15	1989.2	-42.31
5	الكافايين اللامائي Caffeine anhydrous		5	1981.3	-42.54
			10	1875.2	-45.61
			15	1806.3	-47.61
6	داي فينهايدرامين– هايدروكلورايد Diphenhydramine-HCl		5	2249.8	-34.75
			10	2220.9	-35.59
			15	2201.6	-36.15
7	ميترونيدازول Metronidazole		5	1812.5	-47.43
			10	1788.9	-48.12
			15	1733.6	-49.72
8	الكلورامفينكول Chloramphenicol		5	1456.3	-57.76
			10	1325.7	-61.55
			15	1244.9	-63.89
9	باراسيتامول Paracetamol		5	1163.2	-66.26
			10	1123.5	-67.41
			15	1095.7	-68.22
10	الالوبيورينول Allopurinol		5	1248.6	-63.78
			10	1144.3	-66.81
			15	1079.5	-68.69
11	كلورفينيرامين ماليت Chlorpheniramine Maleate		5	2254.3	-34.62
			10	2245.1	-34.89
			15	2239.8	-35.04
12	ديكساميثازون Dexamethasone		5	**4018.6**	**+16.54**
			10	**4123.24**	**+19.57**
			15	**4385,7**	**+27.188**

* علما ان الفعالية القياسية للإنزيم بدون تثبيط (Control) هي 3448.2 وحدة عالمية /لتر.

ومن جانب اخر فقد لوحظ ان هناك زيادة في نشاط فعالية الإنزيم اذ وصلت النسبة المئوي لتنشيط الانزيم ما بين (16.54–27.18) عند استعمال مادة ديكساميثازون (الجدول 3)، اذ لوحظ ايضا في دراسات سابقة ان هناك بعض الأدوية لها تنشيط في فعالية إنزيم البرولايديز مثل الدواء الكيميائي نوع الميليفالين Melphalan [47]. وفي دراسة اخرى وجد ان عند فسفرة الإنزيم من الممكن ان يزيد من فعاليته[51] وكذلك اشارت بعض النتائج السابقة ان لمركب الهيدرازين القدرة على تحفيز بناء الكولاجين من خلال تحفيزه لإنزيم البرولايديز الذي يعمل على زيادة تحرر البرولين ليشارك في عملية اعادة بناء الكولاجين[52]. وإن أي تنشيط او تثبيط للإنزيم هو يكون من خلال التأثير على الموقع الفعال لإنزيم البرولايديز من خلال التأثير على الأحماض الامينية الهستيدين وحامض كلوتاميك وحامض الاسبارتيك التي تشارك في زيادة استقرار الموقع الفعال وفعاليته[14].

ان إنزيم البرولايديز ضعيف في فعاليته التحليلية المائية لمركبات الفسفور العضوية السامة لهذا فأن ايجاد الإنزيم بفعالية عالية جدا ضروري لدعم عملية تحلل تلك المركبات السامة من العوامل العصبية الكيميائية والمبيدات الحشرية مثل مركب Diisopropyl fluorophosphates (DFP) او المركبات ذات التأثيرات العصبية التي تستعمل في الحروب والمثبطة لإنزيم كولين أستريز[53]، ولهذا كان من الضروري ان نعمل على ايجاد الإنزيم بنقاوة جيدة وبفعالية عالية نسبة الى كميته وايجاد المركبات الكيميائية التي تعمل على تنشيط من المركبات الدوائية، فضلا عن ذلك فانه يمكن ان يتم تطوير عملية تكوين الانزيم من خلال تقنية الهندسة الوراثية للإنزيم[53].

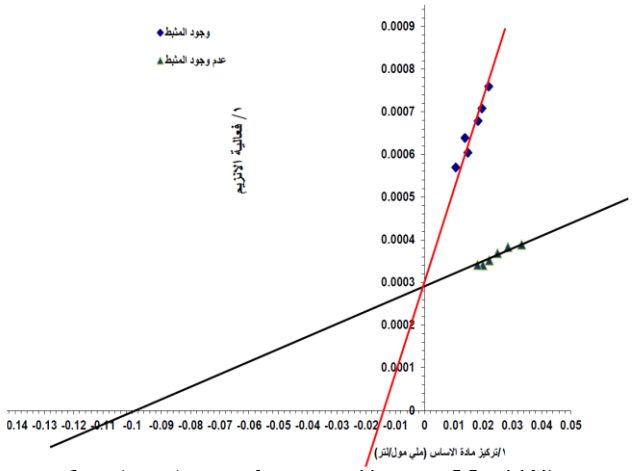
8. تحديد نوعية التثبيط للمركبات الدوائية المحددة في الدراسة:

اشارت النتائج الموضحة في (الاشكال رقم: 11 و12 و13 و16 و18 و19 و20) ان المركبات الدوائية من نوع السيراميد وميتوكلوبراميد وبسيدوفيدرين وداي فيهايدرامين–هايدروكلورايد وكلورامفينكول وباراسيتامول وألوبيرانول اعطوا تثبيطاً من نوع تنافسي Competitive inhibitor، اذ يعتمد هذا التثبيط التنافسي على تركيز المثبط والمادة الأساس والألفة النسبية بين المثبط والمادة الأساس، فبزيادة تركيز المادة الأساس يمكن تقليل نسبة التثبيط الذي يكون تركيبه (المثبط) في الغالب مشابهاً لتركيب مادة الأساس[32]، وباستعمال الرسم البياني لمعادلة لانيويفر– برك بوجود أو عدم وجود المثبط التنافسي نلاحظ ان هناك بقاء قيمة السرعة القصوى V_{max} ثابتة ولكن توجد زيادة في قيمة K_m عند استعمال المركبات الدوائية المثبطة للتفاعل الإنزيمي (أي بمعنى تنخفض ألفة الإنزيم لمادة الأساس)، فقد وجد ان قيمة K_m للمركبات الدوائية السيراميد وميتوكلوبراميد وبسيدوفيدرين وداي فيهايدرامين–هايدروكلورايد وكلورامفينكول وباراسيتامول وألوبيرانول هي:66.6، 71.42، 52.63، 55.55، 83.33، 90.9، 100.0 ملي مول /لتر على التوالي.

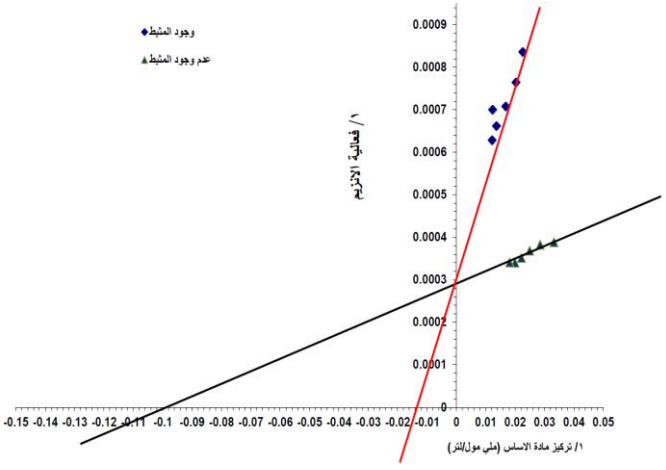
علاوة على ذلك، فقد أظهرت النتائج ايضا ان المركبات الدوائية من نوع ثيوفيلين وكافايين وميترونيدازول وكلورفينيرامين ماليت اعطوا تثبيطاً من النوع غير التنافسي Non-Competitive inhibitor (لاحظ الاشكال 14 و15 و17 و21)، اذ تمتاز تلك الانواع من المثبطات بان تركيب المثبط لا يشابه تركيب المادة الأساس أو قد يشابهه قليلاً، ويرتبط المثبط غير التنافسي عادةً مع الإنزيم في موقع آخر يختلف عن الموقع الفعال أي لا يوجد أي تنافس بين المثبط والمادة الأساس على الاتحاد مع الموقع الفعال للإنزيم لذا فان زيادة تركيز مادة الأساس لا يلغي تأثير عمل هذه المثبطات[32]، اذ يلاحظ من الاشكال (14 و15 و17 و21) ان هناك انخفاضاً في مقدار السرعة القصوى V_{max} مع بقاء قيمة K_m ثابت، ووصل الانخفاض في قيمة V_{max} الى 2173.9، 2439.0، 2000.0 و2325.58 وحدة إنزيم/لتر للأدوية من نوع ثيوفيلين وكافايين وميترونيدازول وكلورفينيرامين ماليت على التوالي .

إن أي مركب يعمل على تثبيط فعالية إنزيم بروليديز وبنسب مختلفة تعمل على تثبيط عملية بناء الكولاجين وبالتالي تؤثر على وظائف وانسجة الجسم المختلفة، كون إنزيم البرولايديز يدخل بشكل رئيس في بناء الكولاجين، وان الكولاجين له تأثير على تراكيب الانسجة الرابطة والمحافظة عليها من خلال زيادة مرونتها لعديد من الاعضاء من الجلد والعظام والغضروف والاوتار[54]، ففي دراسة سابقة من قبل الباحث (Donejko) واخرين[55] لوحظ ان الكافايين يعمل على تثبيط بناء الكولاجين، من خلال تثبيطه لفعالية إنزيم البرولايديز وهذا ما وجدته دراستنا ايضا، فضلا عن ذلك فان للكافايين دوراً تثبيطياً لعملية بناء الحامض النووي DNA، وبما ان الكولاجين وإنزيم البرولايديز لهما دور في عملية بناء وشفاء الجروح وان تثبيطه من قبل الكافايين يمكن ان يؤثر

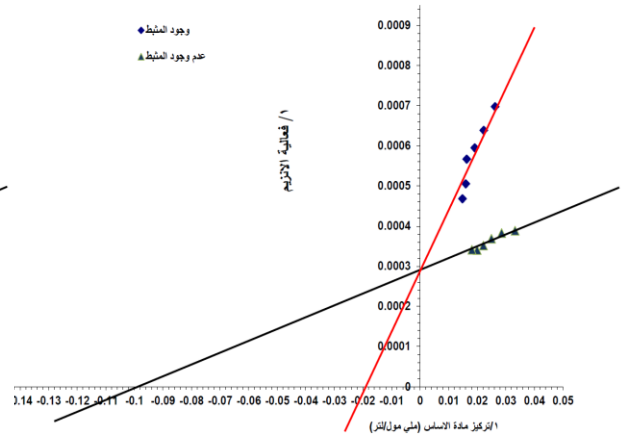
على زيادة سرعة شفاء الجروح [55]. اذ ان الكافايين يعد من المركبات الالكيلويدية (Alkaloids) التي تستعمل مع العديد من الأدوية والذي يكون شائعا ايضا في المشروبات المختلفة وان معدل الاستهلاك اليومي للكافايين يكون بين 3–7 ملغم/كغم من وزن الجسم. ولوحظ ان له دوراً مهماً ضد الالتهابات والامراض السرطانية وله صفات مضادة للأكسدة [56] والذي يشابه في التركيب هو الثيوفيلين الذي اعطى تثبيط ايضا لفعالية الإنزيم وكانت نوعية التثبيط فيه من نوع التثبيط غير التنافسي (لاحظ الشكلين 14 و15). لوحظ في دراسات سابقة ان هناك تأثير تثبيطي للمركب الدوائي كابتوبيرل Captopril على إنزيم البرولايديز المعزول من الكبد والكلية والامعاء الانسان والجرذان (كابتوبيرل دواء يستعمل لمعالجة ارتفاع ضغط الدم)، وله تأثيراً تثبيطياً قليل لإنزيم البرولايديز المعزول من كريات الدم الحمر، إذ أن زيادة طرح الببتيدات المرتبطة مع 4–هيدروكسي برولين دلالة على تثبيط إنزيم البرولايديز بفعل كابتوبيرل[57]. وفي دراسة اخرى لوحظ ان هناك تثبيط تنافسي للإنزيم بوساطة مادة فوسفوانيول بايروفيت PEP التي تتكون خلال مسار كلايكوليسزز Glycolysis والذي ينتج منه البايرفيت بفعل إنزيم بايروفيت كاينيز [58].



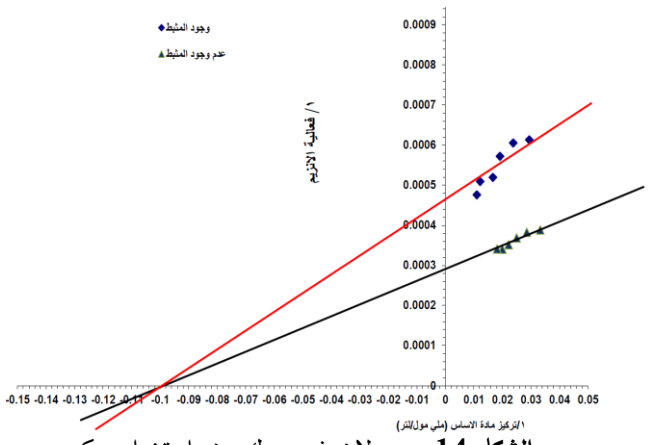
الشكل 11: رسم لاينويفر– برك عند استخدام مركب السيراميد والذي اعطى تثبيط تنافسي.



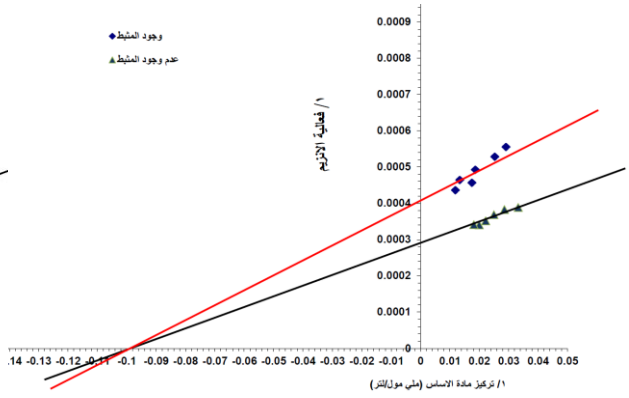
الشكل 12: رسم لاينويفر– برك عند استخدام مركب ميتوكلوبراميد والذي اعطى تثبيط تنافسي.



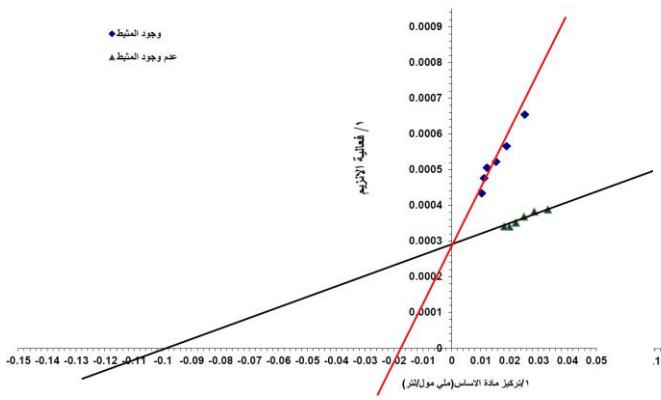
الشكل 13: رسم لاينويفر– برك عند استخدام مركب بسيدوفيدرين والذي اعطى تثبيط تنافسي.



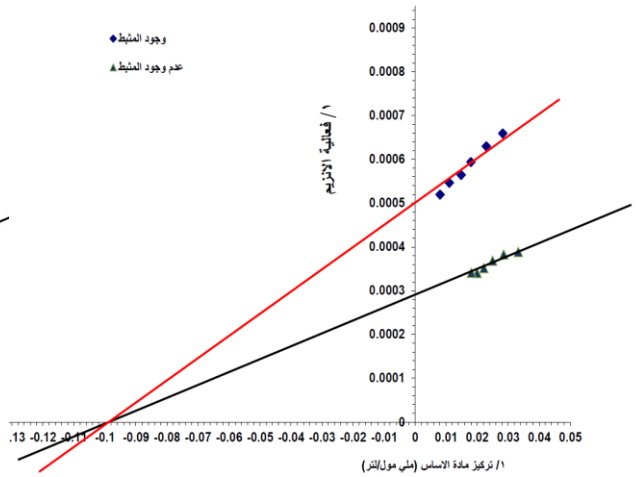
الشكل 14: رسم لاينويفر– برك عند استخدام مركب ثيوفيلين والذي اعطى تثبيط تنافسي.



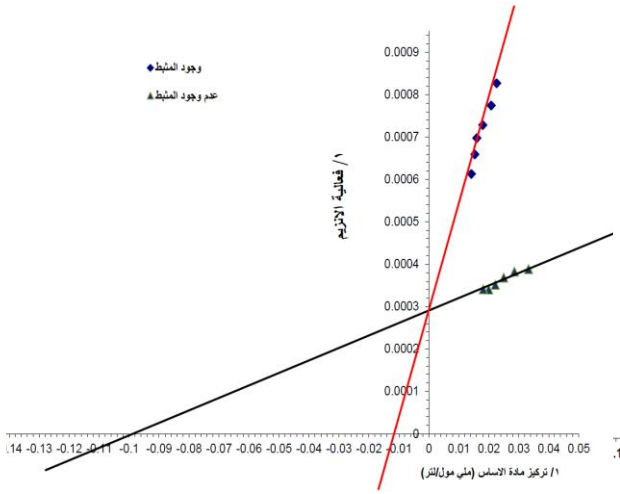
الشكل 15: رسم لاينويفر– برك عند استخدام مركب كافايين والذي اعطى تثبيط غير التنافسي.



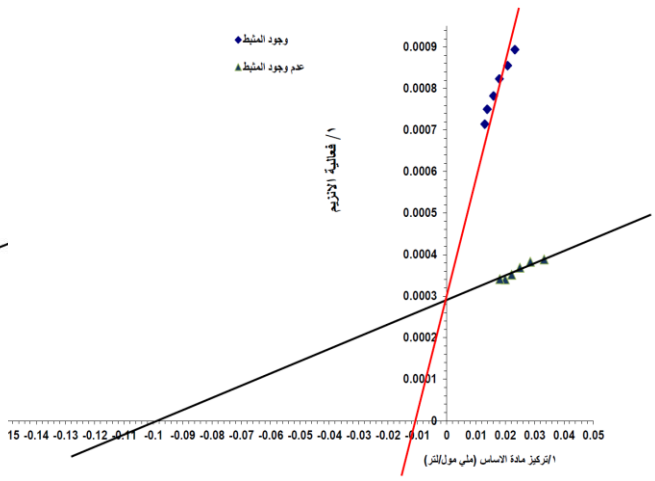
الشكل 16: رسم لاينويفر– برك عند استخدام مركب داي فيهايدرامين–هايدروكلورايد والذي اعطى تثبيط تنافسي.



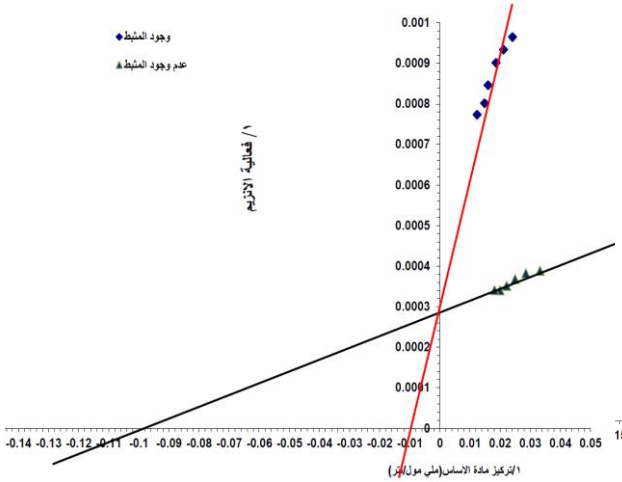
الشكل 17: رسم لاينويفر– برك عند استخدام مركب ميترونيدازول والذي اعطى تثبيط غير التنافسي.



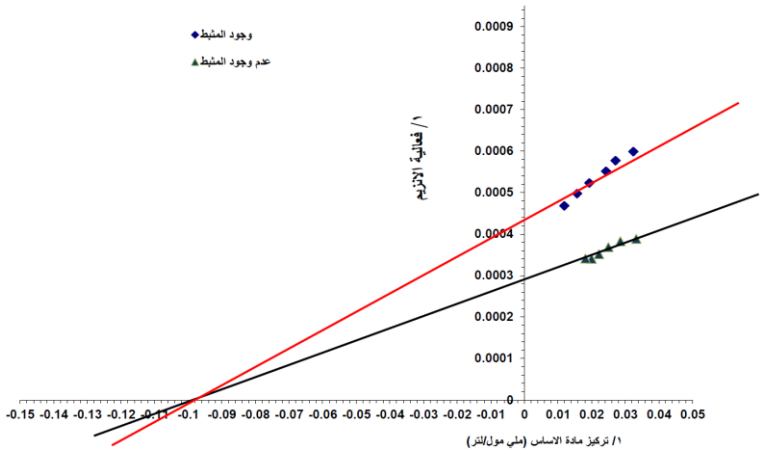
الشكل 18: رسم لاينويفر– برك عند استخدام مركب كلورامفينكول والذي اعطى تثبيط تنافسي.



الشكل 19: رسم لاينويفر– برك عند استخدام مركب باراسيتامول والذي اعطى تثبيط تنافسي.



الشكل 20: رسم لاينويفر– برك عند استخدام مركب ألوبيرانول والذي اعطى تثبيط تنافسي.



الشكل 21 : رسم لاينويفر – برك عند استخدام مركب كلورفينيرامين ماليت والذي اعطى تثبيط غير التنافسي.

الجهة الممولة للبحث ومكان عمل البحث: قسم الكيمياء/ كلية العلوم/ جامعة الموصل/ الموصل– العراق.

المصادر

1) Ernst, P., Alim Pharmacol Ther 13,13-18 (1999).
2) Palka, J.A., Phang, J.M, J. Cell Biochem., 67: 166-175(1997).
3) Sell, D.R. and Monnier, V.M., J. Clin. Invest. 85: 380-384(1990).
4) Surazynski, A., Donald, S.P., Cooper, S.K., Whiteside, M.A., Salnikow, K., Liu, Y., Int. J. Cancer. 122(6):1435–40(2008).
5) Hu, C.A., Phang, J.M., Valle, D., Preface. Amino Acids 35:651–652(2008).
6) Osmancik, P., Louckova, A., Kardiol. Pol. 75:295-305(2017).
7) Di Gregoli, K., Johnson, J.L. "Role of Matrix Metalloproteinases in the Development and Progression of Atherosclerosis", Springer. p.425-46(2017).
8) Rabus, M., Demirbag, R., Yildiz, A., Tezcan, O., Yilmaz, R., Ocak, A.R., Arch. Med. Res. 39:519-24(2008).
9) Pirinççi, N., Kaba, M., Geçit, I., Güneş, M., Yüksel, M.B., Tanık, S., Toxicol Ind Health. 32(2):193–9(2016).
10) Gecit, I., Aslan, M., Gunes, M., Pirincci, N., Esen, R., Demir, H., J. Cancer Res. Clin. Oncol. 138(5):739–43(2012).
11) Ercan, A.C., Bahceci, B., Polat, S., Cenker, O.C., Bahceci, I., Koroglu, A., Sahin, K., Hocaoglu, C., Asian J. Psychiatr. 25:118-122(2017).
12) Aslan, M., Duzenli, U., Esen, R., Soyoral, Y.U., Clin Chim Acta. 473:186-190(2017).
13) Bhatnager, R., Nanda, S., Dang, A.S., Biomark Med. 12(6):597-606(2018).
14) Lupi A, Tenni R, Rossi A, Cetta G, Forlino A., Amino Acids 35:739–752(2008).
15) Petrikovics, I., Cheng, T.C., Papahadjopoulos, D., Hong, K., Yin, R., DeFrank, J.J., Jaing, J., Song, Z.H. et al., Toxicol. Sci., 57:16–21(2000).
16) Theriot, C.M., Tove, S.R., Grunden, A.M., Adv Appl Microbiol. 68:99-132(2009).
17) Simonian, A.L., Grimsley, J.K., Flounders, A.W., Shoeniger, J.S., Cheng, T.-C., DeFrank, J.J. and Wild, J.R.. Anal. Chim. Acta. 442:15–23(2001).

18) Courtin, P., Nardi, M., Wegmann, U., Joutsjoki, V., Ogier, J.C., Gripon, J.C., Palva, A., Henrich, B. et al., Int. Dairy J. 12:447–454(2002).
19) Perugini, P., Hassan, K., Genta, I., Modena, T., Pavanetto, F., Cetta, G., Zanone, C., Iadarola, P. et al., J. Control Release 102:181–190(2005).
20) Brace,R.A., Cheung, C.Y., Adv. Exp. Med. Biol., 814:49–68(2014).
21) Silberstein, T., Saphier,. M., Mashiach, Y., Paz-Talo, O., Saphier, Q., J. Matern. Fetal. Neonatal Med. 18 (1):88-92(2015).
22) Myara, I., Charpentier, C., Lemonnier, A., Clin. Chim. Acta, 125:193-205(1982).
23) Ozcan, O., Gultepe, M., Ipcioglu, O.M., Bolat, B., Kayadibi, H., Turk. J. Biochem., 32:12-16(2007).
24) Chinard, F.P., J. Biol. Chem., 199:91-95(1952).
25) Suga, K., Kabashima, T., Ito, K., Tsuru, D., Okamura, H., Kataoka, J., Yoshimoto, T., Biosci. Biotechnol. Biochem. 59(11):2087-90(1995).
26) Hui, K.S., Lajtha, A., J. Neurochem. 35(2):489-94(1980).
27) Schacterle, G. R., Pollack, R. L., Anal. Biochem. 51:654-655(1973).
28) Plummer, T.D. "An Introduction to Practical Biochemistry". 2nd. Ed., McGraw-Hill Book Comp., U.K(1978).
29) Robyt, F.J., White, J.B. "Biochemical Techniques, Theory and Practice" books/cole publishing company, Monterey, California(2001).
30) Buritis, C. A., Ashwood, E. R., Bruns, D.E. "Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics". By Saunders, an imprint of Elsevier Inc. USA. pp.228, 255(2015).
31) Befani, O., Grippa, E., Saso, L., Turini, P., Mondovi, B., Inflamm. Res., 50:136-137(2001).
32) Nelson, D.L., Cox, M.M. "Lehninger, Principles of Biochemistry". 17th ed. W.H.freeman, New York., pp.600,617, 286, 289(2017).
33) Yoshirnoto, T., Matsubara, F., Kawano, E., Tsum, D., J Biochem (Tokyo) 94, 1889(1983).
34) Sjostrom, H., Norén, O., Josefsson, L., Biochim Biophys Acta 327:457(1973).
35) Endo, F., Tanoue, A., Ogata, T., Motohara, K., Matsuda, I., Clin. Chim. Acta. 176(2), 143-9(1988).
36) Fujii, M., Nagaoka, Y., Imamura, S., Shimizu, T., Biosci Biotechnol Biochem. 60 (7):1118-22(1996).
37) Masuda, S., Watanabe, H., Morioka, M., Fujita, Y., Ageta, T., Kodama, H., Acta. Med. Okayama. 48(4):173-9(1994).
38) Pałka, J.A., Rocz. Akad. Med. Bialymst. 41(2):149-60(1996).
39) Vyas, N.K., Nickitenko, A., Rastogi, V.K., Shah, S.S., Quiocho, F.A., Biochemistry 49:547–559(2010).
40) Harbeck, H., Mentlein, R., Eur. J. Biochem. 198:451-458(1991).
41) Hu, M., Cheng, Z., Zheng, L., Pediatr. Res. 53(6):905-14(2003).
42) Mock, W.L., Green, P.C., J Biol Chem. 265(32):19606-10(1990).
43) Sagara, I.M., Ozak, T., Morioka, E., Wada, K., Hondia, K., Hori, A., Matsuya, Y., Br. J. Pharmacol. 165(1):167-182(2012).
44) You, N., Tao, K., Zhao, W., Bao, P., Li, R., You, H., Zhang, M., Methods Find Exp. Clin. Pharmacol. 32(5):3011-8(2010).
45) Aloorkar, N.H., Bhatia, M.S., Ars. Pharm. 52(3):26-34(2011).
46) Lustar, I., Friedland, I. R., Jafri, H.S., Wubbel, L., Ahmad, A., Trujillo, M., McCoig, C.C., and McCraken, G.H., J. Antimicrob. Chemotherapy., 52:651-655(2003).
47) Chrzanowski, K., Bielawska, A., Bielawski, K., Pałka, J., Wołczyński, S., Farmaco. 59(9):679-84(2004).

48) Miltyk, W., Karna, E., Pałka, J., Pol. J. Pharmacol. 48(6):609-13(1996).
49) Konno, K., Tetsuka, T., J. Biochem., 56(6):581–590(1964).
50) Muszyńska, A., Pałka, J. Gorodkiewicz, E.,52(2):149-155(2000).
51) Surazyński, A., Pałka, J., Wołczyński, S., Mol. Cell Biochem. 220(1-2):95-101(2001).
52) Jackson, S.H., Dennis, A.W., Greenberg, M., CMA J. 113, 759–763(1975).
53) Yun, H., Lee, S., Kim, S., Yu, J., Lee, N., Lee, J., Kim, ND., Yu, C., Rho, J., Protein. Pept. Lett. 24(7):617-625(2017).
54) Fratzl, P., "Collagen: Structure and Mechanics" New York, Springer. P.210(2008).
55) Donejko, M., Przylipiak, A., Rysiak, E., Głuszuk, K., Surażyński, A., Development and Therapy. 8:1923–1928(2014).
56) Merighi, S., Benini, A., Mirandola, P, et al., Mol. Pharmacol., 72:395–406(2007).
57) Ganapathy, V., Pashley, S.J., Roesel, R.A., Pashley, D.H., Leibach, F.H., Biochem. Pharmacol. 34(8):1287-91(1985).
58) Karna, E., Pałka, J.A., Mol. Cell. Biochem. 315:61–67(2008).